

# 酶标法观察尖吻蝾出血毒素 I 对毛细血管的作用

何华平 王玉珍 徐 洵

(中国科学技术大学生物系 合肥)

## 摘 要

从尖吻蝾蛇毒中分离得到的出血毒素 I (AaHI) 具有破坏血管系统并造成广泛出血的作用。本文报道用辣根过氧化物酶标记的 AaHI 可以特异地结合在毛细血管内皮细胞外膜上, 由此推测内皮细胞膜上存在 HaHI 的受体或作用位点。

**关键词:** 尖吻蝾蛇毒, 出血毒素, 酶标, 蛇毒

从尖吻蝾蛇毒中分离得到的出血毒素 I (AaHI) 具有破坏血管壁, 造成广泛出血的作用。早期观察了解到, 出血毒素作用于血管壁后, 血管壁发生破裂 (或毛细血管内皮细胞间隙增大), 红细胞外漏。Ownby 等报道了蛇毒出血毒素对毛细血管破坏作用的电镜观察, 但更深入工作尚未见报道。本文报道使用酶标方法观察 AaHI 在兔肌组织的分布和作用。目的是观察毒素 I 在动物组织中的特异结合位点, 为探讨其出血作用机理及蛇伤防治提供理论基础, 也为临床上其它出血性疾病研究寻求共同规律。

## 材 料 和 方 法

**材料** 出血毒素 I (AaHI), 按文献方法制备; 辣根过氧化物酶 (HRP, RZ33), 2, 4——二硝基氟苯 (FDNB), 均为中科院上海生化所东风生化试剂厂产品; 过碘酸钠 ( $\text{NaIO}_4$ ), 北京化工厂产品, 分析纯; 聚乙二醇 (PEG), Sephadex-G75, Pharmacia 产品; 透射电镜 HITAACHI H800 型; 健康家兔, 约 2.5 kg。

**方法** 用过碘酸氧化法交联 HRP 与 AaHI。5 mg HRP 溶于 1.0 ml 0.3 M pH 8.1 的  $\text{NaHCO}_3$  中, 加入 0.1 ml 1% FDNB, 室温下搅拌 1 小时后加入 1 ml 0.16 M  $\text{NaIO}_4$ , 反应 30 分钟, 然后加入 1 ml 0.16 M PEG, 室温下搅拌 1 小时以终止  $\text{NaIO}_4$  的氧化反应。4℃ 下对 0.01 M pH 9.5 的  $\text{NaHCO}_3$ - $\text{NaCO}_3$  缓冲液充分透析, 除去 FDNB, 加入含

5 mg AaH I 的 0.1M pH9.5 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  缓冲液, 室温下反应 3 小时, 4℃ 下对 0.02M 加磷酸缓冲液充分透析。

Sephadex-G75 过柱。交联产物过 Sephadex-G75 柱, 用 0.02M 磷酸缓冲液平衡、洗脱, 流速 8 ml/hr。

活体处理兔肌肉组织并进行电镜样品制备。家兔死后迅速解剖腿肌, 取一小块立刻投入经液氮预冷的正己烷中, 稍后用锋利刀片将肌块修成约  $2 \times 5 \times 7$  mm 大小, 控制厚度约 25  $\mu\text{m}$  进行冰冻切割, 蒸馏水中迅速展片后捞出至载玻片上, 放潮湿培养皿中, 将 HRP-AaHI 滴在组织切片上, 浸没处理 1 小时, 之后用 0.2M pH7.2 磷酸缓冲液充分漂洗, 加入 HRP 底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 3,3'-二氨基联苯胺四酸盐 (DAB), 显色反应 30 分钟, 用 0.2M pH7.2 磷酸缓冲液充分漂洗; 以下经过常规电镜制片过程: 锇酸固定, 丙酮分级脱水, 渗透, Epon618 包埋, 聚合, 切片, 最后在 HITACHI 800 型分析电镜上观察。

## 结 果

1. 交联产物经 Sephadex-G75 柱分离, 洗脱曲线见图 1。其中 I、II、III 峰分别为 HRP-AaHI (分子量约 66,000)、HRP (分子量约 44,000) 和 AaHI (分子量约 22,000)。收集 HRP-AaHI, 透析、浓缩。

2. 电镜观察。如图 2。

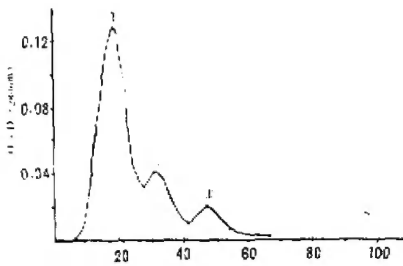


Fig 1. GelFiltration of HRP-AaHI

Sephadex G-75 column (1.5 $\times$ 100) was preequilibrated with 0.02M PBS and eluted with same solution at a flow rate of 8 ml/hr. 2.5ml fractions were collected I-HRP-AaHI II-HRP III-AaHI

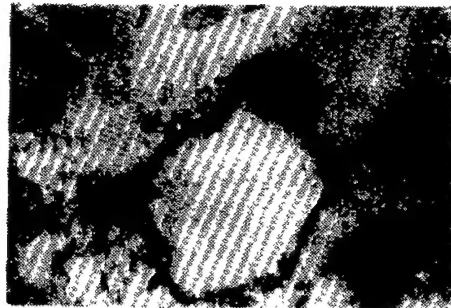


Fig 2. Electromicroscopic photo of HRP-AaHI deposited on capillaries

Specific attachment of HRP-AaHI to the endothelial cells is shown.  $\times 70000$

## 讨 论

尖吻蝮蛇 (即五步蛇) 蛇毒具强血循毒性, 咬伤后主要症状是全身广泛性出血和局部性坏死。本实验室曾从粗毒中分离得到出血毒素 I、II、III, 其中以出血毒素 I 的出血活性最大, 其最小出血剂量为 0.4  $\mu\text{g}$ 。关于蛇毒出血毒素的作用机理, 迄今见到

报道的是Ownby 和 Tsuchiya 分别对 C. Atrox 蛇毒及 T. Flaroridis 蛇毒的出血毒组分进行研究。Ownby 等从电镜观察到出血毒素对血管内皮有直接溶解作用。Tsuchiya 等则观察到在该毒素作用下, 红细胞能直接穿过内皮细胞接合区, 逸出到血管外。但出血毒素和血管壁的相互作用以及更进一步的机理均未阐明。本文用过氧化物酶标记出血毒素 I, 经电镜观察, 了解出血毒素在生物体内作用部位。

本实验对电镜样品未作常规染色, 完全用 HRP 催化过氧化氢和 3, 3'—二氨基联苯胺四盐酸盐的显色反应显示组织结构, 以期真实地反映 AaHI 的作用位点。电镜下可见特异性染色集中于毛细血管内皮细胞外壁周围, 而在其他组织结构处未见明显的特异性染色。由此可推测, AaHI 在毛细血管内皮细胞外壁有相应受体或作用位点。我们推测, AaHI 与内皮细胞外壁受体或作用位点结合后引起受体后水平反应, 继而导致毛细血管内皮细胞壁破裂 (或间隙增大) 而致红细胞外漏, 这可能是出血毒作用机制之一。

### 参 考 文 献

- 康莲娣 1981 尖吻蝮蛇素小鼠骨骼肌和心肌损伤的电子显微镜初步观察。《动物学研究》2(4) 增刊 97。  
 朱培坤 1983 《免疫酶技术》山东科学出版社。  
 Nakane, P. K. and Karwaj, A. 1974 Peroxidase-labelled antibody—A new method of conjugation. *J. Histochem.* 22(12):1084.  
 Ownby, C. L., Kainer, R. A. and Tu, A. T. 1974 Pathogenesis of hemorrhage induced by rattlesnake venom. *Am. J. Pathol.* 75 401.  
 Tsuchiya, M., Ohshio, C., Ohashi, M., Ohsaka, A., Suzuki, K. and Fujshiro, Y. 1974 Cinematographic and electron microscopic analysis of the hemorrhage induced by the main hemorrhagic principle HRI, isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Throm. Diath. Haemorrh., Suppl. LX.* 439.  
 Xu, X., Wang, C., Liu, T. and Lu, Z. 1981 Purification and characterization of hemorrhagic components from *Aghistrodon acutus* (Hundred Pace Snake) venom. *Toxicon* 19(5):633.

## THE EFFECT OF HEMORRHAGIN I (*AGKISTRODON ACUTUS*) IN CAPILLARIES PEROXIDASE CONJUGATED METHODS

He Huaping Wang Yuzhen Xu Xun

(Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei)

Hemorrhagin I (AaHI) isolated from *A. acutus* venom causes rupture of vascular system and extensive hemorrhage. The specific attachment of HRP-AaHI to the endothelial cell by the method of horseradish peroxidase conjugation is reported in this paper. The results suggest that receptor or binding site of hemorrhagin I might be present on the outer-membrane of endothelial cells.

**Key word:** Agkistrodon acutus, Hemorrhagin, Enzyme labeling, Snake venom